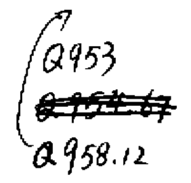
2000, 21(1)
①2-6

动 物 学 研 究 2000, Feb. 21 (1): 2~6 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

综 述

突变型小鼠在学习记忆研究中的应用



梅镇彤
(中国科学院上海生理研究所 上海 200031 ztmei@server.shcnc.ac.cn)

摘要：本文简要介绍了利用突变型小鼠研究学习和记忆的最新进展。提出了行为模型的选择对研究学习和记忆的重要性。在发育的不同时期研究突变型小鼠的行为，将为我们提供有关在发育过程中基因与行为相关性的信息，并有助于我们更全面地了解该基因的功能。

关键词：突变型小鼠；学习记忆；行为模型、基因、神经回路
中图分类号：959.837 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2000)01-002-05

研究脑如何调控行为是神经科学的重要任务之一。所有行为的形成都是基因和环境相互作用的结果，即使非常定型的行为也是受环境影响的。另一方面高度可塑的行为，如语言，也不可能不受先天因素的制约。很显然行为本身并不是遗传的，只有组成基因的DNA才是遗传的。基因携带了机体所有能表达蛋白的氨基酸序列的信息，通过复制来传递这些信息。每一个基因给下一代提供自身的复制品，并在细胞内表达而产生特异的蛋白，这些蛋白决定着细胞的结构、功能以及其他生物特性。这些蛋白对脑内神经回路的发育，维持和调控是至关重要的。神经回路的发育和行为之间的相互作用，已在从果蝇到人类等多种生物体上进行了研究。

1 正向和反向遗传学的应用

实验用小鼠遗传学的研究已有很长的历史，但不如果蝇的遗传学研究那么深人。最近由于转基因及基因替换等技术的成熟，已有可能用这些遗传工程的技术来培育所需要的突变型小鼠。虽然培育突变型小鼠的过程相对较长，但由于小鼠是哺乳动物，与人类在神经解剖学和生理学方面有更多类同之处，因此在小鼠上研究基因突变和行为的相关性问题吸引着众多神经科学工作者。当前在小鼠上进行基因和行为相关性的研究如同70年代在果蝇上的研究一样，不论是正向遗传学（forward genetics）或反向遗传学（reverse genetics），均已广泛应用于小鼠行为的基因基础的研究（Takahashi 等，1994）。

在某种情况下，某种行为明显受遗传的控制，但并不知道有哪些基因参与这种行为的调控，或者知道有那些基因参与，但这些基因并没有被克隆。在这种情况下，我们必须利用正向遗传学，也即从表型到基因的手段来研究这种行为的基因基础。早在1967年Benzer和同事们就开创了用正向遗传学来研究果蝇的行为（Benzer，1967），但在小鼠上这种方法行不通，因为小鼠传代较果蝇慢得多，不可能获得足够数量的子代来供筛选。虽然如此，仍有不少办法可以用于诱发突变，如用X射线照射和用苯丁酸氮芥（chlorambucil）处理均可造成大量的基因缺损，但很难获得大量的突变型动物。烷基化试剂N-ethyl-N-nitrosourea（ENU）是一种较好的诱发突变的试剂，可用于较大量突变型的筛选工作。另一方面，在考虑行为遗传学筛选（behavioral genetic screen）的可行性时，必须设计一套简便易行的行为检测方法，以便用于大量突变型配子的检测。在昼夜节律的研究中成功地进行了由ENU诱发的突变型的筛选，因为昼夜节律行为较容易进行定量测定。正常的C57BL/6J野生型小鼠有很强的昼夜节律性活动（踏转轮的活动有十分明显的昼夜节律性变化）。大约在300只用ENU诱

收稿日期：1999-11-08；修改稿收到日期：1999-12-28
基金项目：国家自然科学基金委资助的重点项目（39630140）

变的小鼠的配子中可获得一只昼夜节律比正常动物长1小时的突变型，被称为 *Clock* 突变型，它是作为半显性常染色体突变（semidominant autosomal mutation）而遗传的（Vitaterna等，1994）。

另一个途径就是利用反向遗传学，也即从基因到表型来研究小鼠的行为。这是目前广泛应用于行为研究的分子遗传学手段，用基因打靶已经培育了数百个品系的突变型，其中有一些突变基因被证明参与了神经信号的传输和突触可塑性变化，也即参与学习和记忆的神经过程。虽然从基因角度来研究哺乳动物的学习和记忆，相对而言还是一个新的领域，然而已经获得了一些很有价值的结果，使我们了解了某些参与不同类型学习和记忆的分子和细胞过程。最先利用基因剔除(gene knockout)来研究学习和记忆的是 Tonegawa 实验室和 Kandel 实验室，他们分析了 Serine-threonine 和 Tyrosine Kinase 在调节海马的突触可塑性和形成有海马参与的学习和记忆中的作用(Silva 等，1992a；Grant 等，1992)。用反向遗传学的方法分析了参与长时程增强(long-term potentiation, LTP)的3个蛋白激酶的基因：CaMKⅡ的α同构体(α-CaMKⅡ)(Silva 等，1992b,c)、非受体型的 typosine kinase fyn 和蛋白激酶 C－同构体(PKC-α)(Abeliovich 等，1993)。Takahashi 等(1994)曾对这一时期的有关工作归纳在一个表中(见表1)。近年来这方面的工作正方兴未艾，如编码一氧化氮合成酶(NOS)和 NMDA 受体亚型的基因等，对它们的行为效应均有报道(Frey 等，1993；Jia 等，1998；Mayford 等，1992)。其他如对 K^+ 通道、CRBE 和小脑中 BDNF 等基因的缺损对行为的影响也均有报道(Geise 等，1998；Gass 等，1998；Bao 等，1998)。Tang 等(1999)在《Nature》上发表了增强学习和记忆能力的基因 NR2B，引起广泛的关注。

表1 基因打靶对行为或突触可塑性的影响

Table 1 Effects of gene targeting on behavior or synaptic plasticity

基因(所表达的蛋白) [gene (protein)]	基因破坏的效应(effect of gene disruption)					
	行为的类型 (type of behavior)	行为	PPF	LTP	LTP(pri)	LTD
Prn-p(PrP^c or Prion)	空间学习	正常	未测试	未测试	未测试	未测试
Camk2a(α－CaMKⅡ)	空间学习	缺损	减弱	缺损	缺损	缺损
fyn(Fyn)	空间学习	缺损	正常	缺损	未测试	未测试
src, yes, abl	未测试	未测试	正常	正常	未测试	未测试
Pkcc(PKC-γ)	空间和场景学习	轻度缺损	稍有增强	缺损	正常	正常
Syn－1(synapsin 1)	未测试	未测试	增强	正常	未测试	未测试
Ncam(N-CAM)	空间学习	缺损	未测试	未测试	未测试	未测试
NOS－*α*(neuronal nitric oxide synthase)	未测试	未测试	正常	稍有压抑	未测试	正常

PPF. 跟随刺激的易化作用(paired-pulse facilitation)；LTP. 长时程增强(long-term potentiation)；LTP(pri). 预处理的长时程增强[long-term potentiation (primed)]；LTD. 长时程压抑(long-term depression)(引自 Takahashi 等，1994，稍加修改)。

2 行为模型选择的重要性

由于问题的复杂性，在解释突变基因的作用时存在着不少值得注意的问题，例如，如何把基因对发育的影响和对行为的直接作用区分开来；还有代偿机制可能掩盖基因的作用，最后还必须考虑行为变异的遗传背景问题等(Silva 等，1997c)。纯种品系的保持比较困难，对其行为的了解也十分不够。基因替代后常常是第二代(F_2)和第三代(F_3)才获得突变型，其遗传学背景在杂交过程中也可能发生变化。另外，利用突变型小鼠研究学习和记忆时，行为模型的选择是至关重要的。曾报道，Fyn－激酶缺损的突变型小鼠在八臂迷宫的训练中表现出惧怕反应增强，而空间学习并不受影响。作者并认为这种突变型小鼠在水迷宫中学习能力低下是由于应激反应导致的活动增强(Miyakawa 等，1996)。设计合理的多臂迷宫对小鼠来说应比水迷宫较少应激性反应。我们利用条件性回避反应模型研究了 Fyn－激酶缺损突变型小鼠的联合型学习能力(Mei 等，1998)。用于进行小鼠条件性回避反应的实验箱，箱底为铜棒栅，可以通电。实验箱分隔成起始区，过道及安全区，各区间可以相通，起始区与过道间有一活动小门，可以关开。首先测定小鼠对电击的阈值，即驱使小鼠跑向安全区的最低电压。各组动物间对电击引起逃避的阈值有较大差异(见表2)。从表2可以看出纯合子 *fyn* 突变型小鼠对电击逃避的阈值明显低于杂合子突变型和野生型小鼠。实验时不同小鼠所用电击的强度不同，这样就可以使小鼠的惧怕反应降到最小。测试强度的电击次数不超过3次，并使小鼠在箱内适应10～15 min，然后开始训练。训

练开始时将小鼠放入实验箱的起始区,关闭活动门,用灯光(40 W)作为条件刺激,以电击强化来建立条件反射。灯光单独作用的时间为5 s,再与电击结合5 s,灯光亮时活动小门同时打开。结合数次后,当灯光单独亮时小鼠即跑向安全区逃避电击,这为条件性回避反应。10次条件刺激中出现9次条件性反应作为学会的标准。实验结果表明,Fyn-激酶缺损的突变型小鼠(纯合子)的联合型学习能力明显低于杂合子和野生型,达到学会标准所需的训练次数为(79.1±30.1)次。杂合子和野生型达到学会标准所需的训练次数分别为(27.4±7.8)次和(34.9±10.9)次(图1)。纯合子突变型小鼠分别与杂合子和野生型学习能力的差异均非常显著。以前利用水迷宫和八臂迷宫的实验结果认为Fyn-激酶缺损小鼠学习能力没有影响的结论是值得商榷的。条件性回避反应的建立是一种联合型学习,而联合型学习是更为重要的一种学习型式,因此我们认为利用联合型学习的模型即经典条件反射模型来研究突变型小鼠的学习和记忆是行为基因相关性研究的一个重要方面。学习和记忆并不是单一的神经过程,从某一行为模型上所获得的结果简单地推断出基因与学习记忆的关系,往往会导致不全面,甚至错误的结论,另一方面由于对小鼠行为的研究远滞后于大鼠行为的研究,设计一整套适合于小鼠行为测试的实验方法对推动基因和行为相关性的研究应具有重要意义。

3 发育不同时期的行为研究

在转基因动物发育的不同时期,转入基因的表达可能有所不同,因此在研究转基因突变型小鼠的行为时应考虑到发育的不同阶段。本实验室与中国科学院上海细胞研究所合作已成功地将GABA转

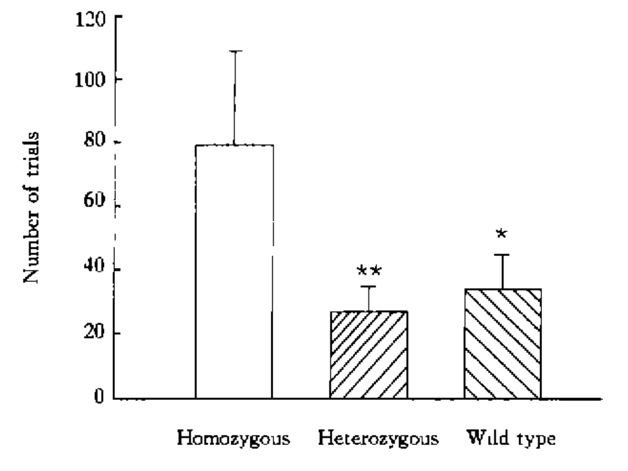


图1 Fyn缺损小鼠和野生型小鼠学习能力的比较
Fig.1 Comparison of learning ability of Fyn-deficient mice with that of wild type
* $P<0.001$ 和 ** $P<0.005$ 均为与纯合子组比较(compared with homozygous group)。

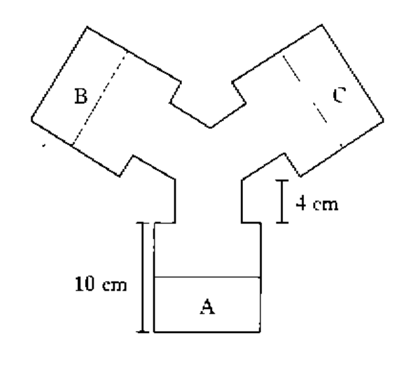


图2 进行交互行为测试的辐射式三臂迷宫
Fig.2 Schematic diagram of tri-equal arm maze for alternative behavior test (details in text)

表2 驱使小鼠跑向安全区的最低电击强度

Table 2 Minimal intensity (volts) of electric shock for driving the mouse to run to the safe compartment

纯合子(*fyn* homozygotes)		杂合子(*fyn* heterozygotes)		野生型(wild type C57BL/6J)	
Mouse No.	Intensity	Mouse No.	Intensity	Mouse No.	Intensity
1	12	2	15	3	17
5	12	9	14	4	20
7	11	12	15	6	19
13	11	16	14	8	17
20	11	17	12	10	17
22	13	18	13	14	18
23	12	21	13	15	18
B	11	A	12	24	15
Mean±s.e.m.	11.8±0.66	Mean±s.e.m.	13.5±1.1	Mean±s.e.m.	17.6±1.41

Homozygotes compared with heterozygotes $P<0.005$ ($n=8$); Homozygotes compared with wild type $P<0.001$ ($n=8$); Heterozygtes compared wild type $P<0.001$ ($n=8$).

运蛋白的基因 *GAT* 1 转入小鼠，并对其行为进行了初步探讨。所用小鼠为第 4 代纯系 *GAT* 1 转基因小鼠，除采用条件性回避反应的模型外，我们还运用辐射式三臂迷宫对该动物的活动状态（locomotor activity）和交互行为（alternative behavior）进行了观察（Sarter 等，1988）。辐射式三臂迷宫如图 2 所示，小鼠进入臂并越过中线作为进臂标准，在一定时间内（8 min）进入各臂的总数代表小鼠的活动状态。交互行为定义为连续 3 次进入臂中无一次重复，并以占总数的百分比来表示交互行为的能力。也即短时工作记忆的能力。数据的分析举例说明如下：设三臂为 A、B、C，而实验小鼠的实际活动情况（即进入各臂的次数和次序）如下：ABCBABCBACBAACB。进入臂的总数为 15，连续 3 次中不重复进入一臂的总数应为 15－2＝13，而该小鼠连续 3 次中不重复进入一臂只有 8 次，所以占总数的百分比为 8/13×100%＝61.5%。实验结果表明，不论 1 月龄或 4 月龄的纯合子 *GAT* 1 转基因小鼠，其活动均少于相应月龄的野生型小鼠（图 3），它们之间具有显著性差异。1 月龄 *GAT* 1 转基因小鼠的活动较 4 月龄的为多，在野生型小鼠中也观察到类似现象。交互行为的测试结果表明，*GAT* 1 转基因小鼠与野生型间没有显著性差异、不同月龄间的差异也不显著。条件性回避反应是一种联合型学习，属经典条件反射，过去在小鼠行为的研究中较少应用。我们的实验结果表明，*GAT* 1 基因转入小鼠后，其联合型学习能力明显降低，4 月龄的 *GAT* 1 转基因小鼠需要（67.1±6.8）次训练才能达到学会的标准，而 4 月龄野生型小鼠只需（34.6±4.9）次即能达到学会标准，两者间差异显著（$P<0.001$）。1 月龄 *GAT* 1 转基因小鼠需训练（65±9.6）次才能达到学会的标准，较 1 月龄野生型小鼠为慢，与 4 月龄 *GAT* 1 转基因小鼠相比没有显著性差异。而 1 月龄野生型小鼠需（47.9±4.6）次才能达到学会的标准，较 4 月龄野生型小鼠为慢（图 4）。以上结果表明，在发育过程中 *GAT* 1 基因的表达可能有所不同。

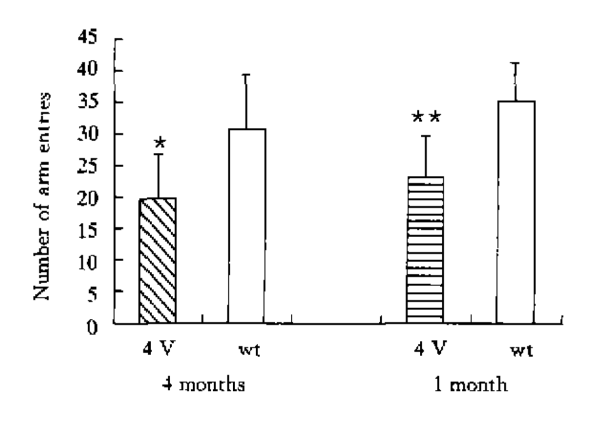


图 3　不同月龄 *GAT* 1 转基因小鼠自发活动的比较

Fig.3　Locomotor activity of *GAT* 1 transgenic mice with different ages

4V：纯合子 *GAT* 1 转基因小鼠（*GAT* 1 homozygotes）；wt：相同月龄的野生型小鼠（wild type C57BL/6J of the same age）；* $P<0.01$ 和 ** $P<0.001$ 均为与相同月龄野生型小鼠比较（compared with wild type mice of the same age）。

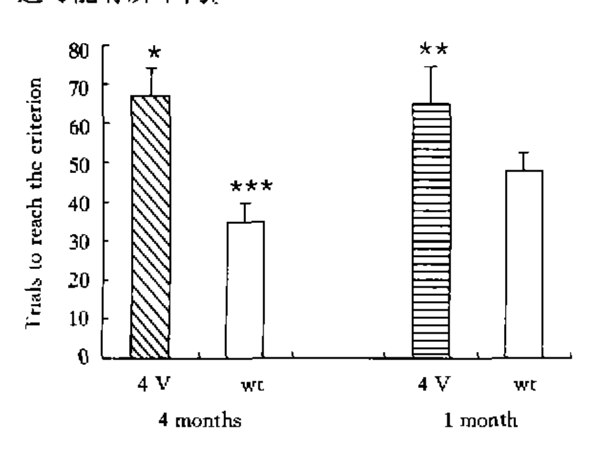


图 4　不同月龄 GAT 1 转基因小鼠联合型学习能力

Fig.4　Learning ability of *GAT* 1 transgenic mice with different ages

4V：纯合子 *GAT* 1 转基因小鼠（*GAT* 1 homozygotes）；wt：相同月龄的野生型小鼠（wild type C57BL/6J of the same age）；* $P<0.001$ 和 ** $P<0.001$ 均为与相同月龄野生型小鼠比较（compared with wild type mice of the same age）；*** $P<0.001$ 与 1 月龄野生型小鼠比较（compared with wild type of 1 month old）。

4　结束语

总之，基因与行为相关性研究，对了解人类的某些行为，以及某些神经和精神性疾患的病因具有特殊重要的意义。利用突变型小鼠来研究基因与行为的相关性是神经科学的新领域，又由于问题的复杂性，很多问题有待我们去探索和解决。脑如何调控行为的问题需要从不同的途径和不同的角度，多学科地来进行探讨，不可能完全依赖于基因突变的手段来解决。学习和记忆也不是一个单一的神经过程，因此它们的机制也必定是多样的。不同类型的学习和记忆可能有不同的神经基础。阐明学习和记忆的神经机制是揭示脑的奥秘的重要内容，是神经科学工作者为之奋斗的目标。从目前来看，利用突

变型动物来研究这一问题，不失为一种有效的途径；另一方面也将有助于我们对某些基因功能的了解，进而深入了解人类基因的功能，将是21世纪人类面临的重大科学问题。

参考文献

Abeliovich A, Chen C, Goda Y *et al*, 1993. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC_g-mutant mice[J]. *Cell*, **75**(7): 1253 – 1262.

Bao S, Chen L, Qiao X *et al*, 1998. Impaired eye-blink conditioning in waggler, a mutant mouse with cerebellar BDNF deficiency [J]. *Learning and Memory*, **5**: 355 – 364.

Benzer S, 1967. Behavior mutants of drosophila isolated by countercurrent distributions[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**: 1112 – 1119.

Frey U, Huang Y Y, Kaandel E R, 1993. Effects of cAMP stimulate a late stage of LTP in hippocampal CA 1 neurons[J]. *Science*, **260**: 1661 – 1664.

Gass P, Wolfer D P, Balschun D *et al*, 1998. Deficits in memory tasks of mice with CREB mutations depend on gene dosage[J]. *Learning and Memory*, **5**: 274 – 288.

Geise K P, Storm J F, Reuter D *et al*, 1998. Reduced K^+ channel inactivation, spike broading, and after hyperpolarization in Kvb1. 1-deficient mice with impaired learning[J]. *Learning and Memory*, **5**: 257 – 273.

Grant S G N, O'Dell T J, Karl K A *et al*, 1992. Impaired long-term potentiatin, spatial learning and hippocampal development in *fyn* mutant mice[J]. *Science*, **258**: 1903 – 1910.

Jia Z, Lu Y M, Henderson J *et al*, 1998. Selective abolition of the NMDA component of long-term potentiation in mice lacking mGluR5 [J]. *Learning and Memory*, **5**: 331 – 343.

Mayford M, Berzilai A, Keller F *et al*, 1992. Modulation of an N-CAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia* [J]. *Science*, **256**: 638 – 644.

Mei Z T, Ma X F, Yagi T *et al*, 1998. Study on learning and memory of fyn tyrosine kinase-deficient mice[A]. In: Conference on life sciences for the 21st century, May 5 – 6, 1998, Beijin, China[C]. (纪念北大百年校庆论文集)53.

Miyakawa T, Yagi T, Kagiyama A *et al*, 1996. Radial maze performance, open-field and elevated plus-maze behaviors in Fyn-kinase deficient mice: further evidence for increased fearfullness[J]. *Mol. Brain Res.*, **37**: 145 – 150.

Sarter M, Bodewitz G, Stephens M, 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and agonist β-carbolines[J]. *Psychopharmacology*, **94**: 491 – 495.

Silva A J, Stevens C F, Tonegawa S *et al*, 1992a. Deficient hippocampal long-term potentiation in a-calciumcalmo-dulin kinase Ⅱ mutant mice[J]. *Science*, **257**: 201 – 206.

Silva A J, Paylor R, Wehner J M *et al*, 1992b. Impaired spatial learning in a-calcium-calmodulin kinase Ⅱ mutant mice[J]. *Science*, **257**: 206 – 211.

Silva A J, Smith A M, Giese K P *et al*, 1997. Targeting and the biology of learning and memory[J]. *Annu. Rev. Genet.*, **31**: 527 – 546

Takahashi J S, Pinto L H, Vitaterna M H, 1994. Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse[J]. *Science*, **264**: 1724 – 1732.

Tang Y P, Shimizu E, Dube G R *et al*, 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. *Nature*, **401**(6748): 63 – 69.

Vitaterna M H, King D P, Chang A M *et al*, 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior[J]. *Science*, **264**: 719 – 725.

STUDY ON LEARNING AND MEMORY OF MUTANT MICE

MEI Zhen-tong

(*Shanghai Institute of Physiology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031 *ztmei@server.shcnc.ac.cn*)

Abstract: Recent progress in study on learning and memory of mutant mice was summarized in this paper. In our work the conditioned avoidance training of Fyn-deficient mice was carried out in a one way avoidance box. In order to avoid eliciting the hyperreactivity to the aversive stimulus, the minimal intensity of electric shock for driving the mouse to run to the safe compartment. The homozygous mutant mice needed much more numbers of trials (79.13 ± 30.1) for reaching the learning criterion than heterozygous (27.38 ± 7.86) and wild-type (34.87 ± 10.9) mice did. These results showed that Fyn-deficiency impairs associative learning. It was supposed that to select the proper behavioral models seems very important for studying on learning and memory of mutant mice. The behavioral model of conditioned avoidance task may be useful for behavioral study of mutant mice. Moreover, as the gene expression may be different in defferent stages of development, to study the behavioral changes of transgenic mice in different stage of development will provide us more information about the functions of genes. The preliminary results of our recent study on behavior of GABA-transported gene (*GAT* 1) transgenic mice showed that in adult mice *GAT* 1 was expressed much more than that in young animals.

Key words: Mutant mice; Learning and memory; Behavioral models